

⑯ BUNDESREPUBLIK

DEUTSCHLAND



DEUTSCHES
PATENTAMT

⑯ Offenlegungsschrift

⑯ DE 3048883 A1

⑯ Aktenzeichen:

⑯ Anmeldetag:

⑯ Offenlegungstag:

⑯ Int. Cl. 3:

C 08 F 2/22

C 08 F 20/32

C 12 Q 1/00

C 12 N 11/08

C 07 G 7/00

G 01 N 33/54

P 30 48 883.6

23. 12. 80

15. 7. 82

⑯ Anmelder:

Boehringer Mannheim GmbH, 6800 Mannheim, DE;
Tschechoslowakische Akademie der Wissenschaften,
11142 Praha, CS

⑯ Vertreter:

Grußdorf, J., Dipl.-Chem. Dr.rer.nat.; Daum, M., Dr.-Ing.,
Pat.-Ass., 6800 Mannheim

⑯ Erfinder:

Batz, Hans-Georg, Dr.rer.nat., 8132 Tutzing, DE; Tanswell,
Paul, Dr.phil., 8033 Planegg, DE; Baier, Manfred, Dr.rer.nat.,
8134 Pöcking, DE; Bouchal, Karel, Dr.-Ing., 150 00 Prag, CS;
Kalal, Jaroslav, Prof. Dr.-Ing., 160 00 Prag, CS; Svec,
Frantisek, Dr.-Ing., 273 43 Hrebec, CS; Zurkova, geb. Hrubá,
Eva, 147 00 Praha, CS; Kalal, Jaroslav, Prof. Dr.Ing., 160 00
Praha, CS; Svec, Frantisek, Dr.-Ing., 273 43 Hrebec, CS;
Zurkova, geb. Hrubá, Eva, Dr.-Ing., 147 00 Praha, CS

⑯ Hydrophile Latexpartikel, Verfahren zu deren Herstellung und deren Verwendung

TEST AVAILABLE COPY

~~23.12.00~~Patentansprüche

- 1 1. Aus einem Homo- oder Copolymerisat von in Wasser schwerlöslichen Monomeren bestehende hydrophile Latexpartikel, dadurch gekennzeichnet, daß sie durch Emulsionspolymerisation in Anwesenheit eines wasserlöslichen, Radikale bildenden Initiators, jedoch ohne jeden Zusatz eines Emulgators, Stabilisators oder Netzmittels herstellbar sind.
- 5
2. Hydrophile Latexpartikel nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß das Monomer (im Falle eines Homopolymerisats) bzw. ein Teil der Monomeren (im Falle eines Copolymerisats) ein mindestens eine polymerisierbare C=C -Doppelbindung im Molekül enthaltendes Epoxid ist.
- 10
15 3. Hydrophile Latexpartikel nach Anspruch 2, dadurch gekennzeichnet, daß das Monomer bzw. ein Teil der Monomeren eine Epoxy-alkylen-Verbindung bzw. ein Glycidylester oder Glycidyläther ist.
- 20 4. Hydrophile Latexpartikel nach Anspruch 3, dadurch gekennzeichnet, daß das Monomer bzw. ein Teil der Monomeren Glycidylacrylat oder Glycidylmethacrylat ist.

24 10.00
2.

- 1 5. Hydrophile Latexpartikel nach einem der Ansprüche 1 bis 4, dadurch gekennzeichnet, daß das Homo- oder Copolymerisat mit Hilfe eines zwei- oder mehrfach ungesättigten Vernetzungsmittels vernetzt ist.
- 5 6. Hydrophile Latexpartikel nach einem der Ansprüche 1 bis 5, dadurch gekennzeichnet, daß die Teilchen monodisperse Kugelchen sind und einen untereinander nahezu gleich großen Durchmesser von zwischen 0,15 und 1,5 µm besitzen.
- 10 7. Hydrophile Latexpartikel nach einem der Ansprüche 1 bis 6, dadurch gekennzeichnet, daß das Homo- oder Copolymerisat endständige Hydroxyl-, primäre oder sekundäre Amino-, Thiol-, Aldehyd- oder Carboxylgruppen aufweist.
- 15 8. Hydrophile Latexpartikel nach einem der Ansprüche 1 bis 7, dadurch gekennzeichnet, daß sie einpolymerisierte Farbstoffe oder fluoreszierende Verbindungen enthalten.
- 20 9. Verfahren zur Herstellung der hydrophilen Latexpartikel gemäß einem der Ansprüche 1 bis 8, dadurch gekennzeichnet, daß ein in Wasser schwerlösliches Monomer oder verschiedene in Wasser schwerlösliche Monomere in Wasser dispergiert und unter Ausschluß von Sauerstoff, beispielsweise in einer Inertgasatmosphäre, durch Emulsionspolymerisation in Anwesenheit eines wasserlöslichen, Radikale bildenden Initiators, jedoch ohne jeden Zusatz eines Emulgators, Stabilisators oder Netzmittels homo- oder copolymerisiert werden.

35

ORIGINAL INSPECTED

25
3
10.10.00

- 1 10. Verfahren nach Anspruch 9, dadurch gekennzeichnet,
daß ein mindestens eine (co)polymerisierbare
C = C -Doppelbindung im Molekül enthaltendes Epoxid,
gegebenenfalls im Gemisch mit anderen copolymerisier-
baren Monomeren, in Wasser dispergiert und durch
Emulsionspolymerisation ohne Zusatz eines Emulga-
tors homo- oder copolymerisiert wird.
- 5 11. Verfahren nach Anspruch 10, dadurch gekennzeichnet, daß als
Epoxid eine Epoxy-alkylen-Verbindung bzw. ein Glycidylester
oder Glycidyläther verwendet wird.
- 10 12. Verfahren nach Anspruch 10 oder 11, dadurch gekenn-
zeichnet, daß als Epoxid Glycidylacrylat oder
Glycidylmethacrylat verwendet wird.
- 15 13. Verfahren nach einem der Ansprüche 9 bis 12 , dadurch
gekennzeichnet, daß die Emulsionspolymerisation
unter Zusatz eines zwei- oder mehrfach ungesättigten
Vernetzungsmittels durchgeführt wird.
- 20 14. Verfahren nach einem der Ansprüche 9 bis 13 , dadurch
gekennzeichnet, daß bei der Emulsionspolymerisation
das Flottenverhältnis (Wasser : Monomerenphase)
25 8 : 1 bis 16 : 1, bezogen auf die Volumina, beträgt.
- 25 15. Verfahren nach einem der Ansprüche 9 bis 14 , dadurch
gekennzeichnet, daß die Initiatorkonzentration in
der wäßrigen Phase 0,5 bis 1,5 g/l beträgt.
- 30 16. Verfahren nach einem der Ansprüche 10bis 15 , dadurch
gekennzeichnet, daß die Konzentration des Epoxids
in der Monomerenphase 1 bis 100 Gew.% beträgt.
- 35 17. Verfahren nach einem der Ansprüche 9 bis 16 , dadurch
gekennzeichnet, daß die Emulsionspolymerisation
bei einer Temperatur von zwischen 0° und 80°C durch-
geföhrt wird.

26
100.100.00
4.

- 1 18. Verfahren nach einem der Ansprüche 9 bis 17, dadurch gekennzeichnet, daß der endständige Epoxid-Gruppen enthaltende Latex noch während oder nach der Emulsionspolymerisation mit wäßriger Alkalihydroxidlösung, wäßriger Ammoniaklösung, mit einem primären Amin, einem Hydrazin oder einem Sulfid, einer Hydrolyse, Ammonolyse, Aminolyse oder Thiolyse unterworfen wird, so daß sich endständige Hydroxyl-, gegebenenfalls mono- oder disubstituierte Aminogruppen oder Thiolgruppen bilden, welche gegebenenfalls anschließend enzymatisch oder mit Periodat bzw. Periodsäure in Aldehydgruppen übergeführt werden.
- 5 19. Diagnostisches Mittel, enthaltend hydrophile Latexpartikel gemäß einem der Ansprüche 1 bis 8 als Träger und an diesen Träger direkt oder über ein Kupplungsmittel als "Brücke" kovalent gebundene biologisch und/oder immunologisch aktive Substanzen.
- 10 20. Diagnostisches Mittel gemäß Anspruch 19, dadurch gekennzeichnet, daß es als biologisch und/oder immunologisch aktive Substanzen Peptide, Proteine, Enzyme, Hormone, Vitamine, Antigene, Antikörper oder Mikroorganismen enthält.
- 15 25 21. Diagnostisches Mittel gemäß Anspruch 20 zur Bestimmung von Thyroxin, dadurch gekennzeichnet, daß es als biologisch und/oder immunologisch aktive Substanz einen Thyroxin-Antikörper enthält.
- 20 30 22. Diagnostisches Mittel gemäß Anspruch 20 zur Bestimmung von Human-Thyreotropin, dadurch gekennzeichnet, daß es als biologisch und/oder immunologisch aktive Substanz einen Human-Thyreotropin-Antikörper enthält.

23.12.80

S. 2350

Tschechoslowakische Akademie der Wissenschaften
Narodni 3, 111 42 Prag

Boehringer Mannheim GmbH
Sandhofer Straße 116, 6800 Mannheim 31

Hydrophile Latexpartikel, Verfahren zu deren
Herstellung und deren Verwendung

Die Erfindung betrifft hydrophile Latexpartikel, ein Verfahren zu deren Herstellung und deren Verwendung als Trägermaterial für biologisch und/oder immunologisch aktive Substanzen in diagnostischen Mitteln.

5

Für die Agglutination von Antigen-Antikörper-Komplexen, die in der Immunologie im Rahmen vieler diagnostischer Bestimmungen ausgenutzt wird, weil sie besonders schnell und einfach durchgeführt und häufig mit bloßem Auge beobachtet werden kann, verwendet man seit langem hydrophobe Latexpartikel als Träger von immunologisch aktiven Substanzen, beispielsweise von Antikörpern. Diese hydrophoben Latexpartikel bestehen meist aus Polystyrolhomopolymeren, beispielsweise Styrol-Butadien-Copolymeri-

- 26.10.2000
- 1 saten oder Acrylnitril-Butadien-Styrol-Copolymerisaten (ABS) und werden durch Emulsionspolymerisation hergestellt.
 - 5 Bei der seit langem bekannten Emulsionspolymerisation sind im allgemeinen vier Komponenten zugegen: ein in Wasser schwerlösliches Monomer oder ein Gemisch verschiedener in Wasser schwerlöslicher Monomerer, Wasser, ein Emulgator und ein wasserlöslicher Initiator. Das
 - 10 Monomere wird dabei durch den Emulgator in Form feiner Tröpfchen emulgiert, wobei sich durch Zusammenlagerung von mehreren Emulgatormolekülen u.a. größere Micellen bilden, die teilweise leer und teilweise mit Monomermolekülen gefüllt sind; letzteres wird als "Solubilisierung" des Monomeren bezeichnet. Der wasserlösliche Initiator bildet Radikale, die die Polymerisation sowohl von einzelnen Monomermolekülen in der Wasserphase als auch in den monomergefüllten Micellen sowie in den Monomertröpfchen auslösen bzw. aktivieren können. Tatsächlich findet
 - 15 aber die Polymerisation überwiegend in den gequollenen Micellen statt, da einerseits die Monomerkonzentration in den Micellen wesentlich größer ist als in der Umgebung einzelner gelöster Monomermoleküle und andererseits die Wahrscheinlichkeit der Aktivierung von Micellen wegen
 - 20 ihrer im Vergleich zur Zahl der Monomertröpfchen wesentlich größeren Anzahl beträchtlich höher ist. Der Durchmesser der gefüllten Micellen nimmt während der Polymerisation zu, bis diese schließlich in kugelförmige Latexteilchen übergehen. Die Emulgatormoleküle der nichtaktivierte Micellen und diejenigen aus der Oberfläche der verbrauchten Monomertröpfchen bedecken die Oberfläche der Latexteilchen und tragen so zur Stabilisierung der entstehenden Polymerdispersion bei.
 - 25
 - 30
 - 35 Diese nach dem bekannten Verfahren unter Zusatz eines Emulgators oder Emulsionsstabilisators, welcher beispielsweise ein Tensid oder Netzmittel sein kann, hergestellten Latices haben folgende Nachteile, die insbesondere ihre

ORIGINAL INSPECTED

23 - 12 = 11

- 1 Verwendung als Träger von immunologisch aktiven Substanzen stören und ihren Einsatz in kontinuierlichen Lösungsmeßsystemen verhindern:

5

 1. An der hydrophoben Oberfläche der Latexpartikel werden neben den gewünschten immunologisch aktiven Substanzen, beispielsweise Antikörpern, unspezifisch eine Vielzahl anderer Serumbestandteile gebunden;
 2. die nur adsorptiv, nicht kovalent gebundenen immunologisch aktiven Substanzen können sich während der Messung im Verlauf eines diagnostischen Tests wieder ablösen;
 3. die bei der Emulsionspolymerisation als Emulgator oder Stabilisator verwendeten Tenside können die Struktur und damit die Aktivität der biologisch aktiven Proteine zerstören, weil sie in die wässrige Lösung diffundieren;
 4. beim Entfernen der sie stabilisierenden Tenside koaguliert die Latexsuspension und auch beim Zentrifugieren wird die Stabilisierung gebrochen. Der hierbei entstehende Niederschlag kann nur schwer oder überhaupt nicht mehr zum vorherigen Zustand resuspendiert werden.

25

Zur Vermeidung dieser Nachteile wurden bereits verschiedene Vorschläge gemacht, die aber immer nur einen Teil der vorstehend genannten Probleme lösen konnten:

- 30 So sind aus der DE-AS 22 03 377 hydrophobe Latexpartikel mit einer Teilchengröße von 0,01 bis 0,9 µm aus carboxylierten ABS-Copolymeren und carboxylierten Styrol-Butadien-Copolymeren bekannt, die als serologisch inerte Träger für biologisch aktive Proteine verwendet werden können, wobei die Proteine kovalent an den Träger gebunden werden, und zwar über die in den Latex eingeführten Carboxylgruppen, unter Ausbildung von Amidbindungen.

100-10-000
A-8.

1 Aus der DE-OS 28 12 845 sind hydrophobe Latices mit einer Teilchengröße von 0,05 bis 1 μm aus ABS-Copolymeren bekannt, bei denen der Latex ebenfalls mit Carboxylgruppen modifiziert und mit einer reaktiven Seitenkette kondensiert ist, so daß immunologisch aktive Substanzen ebenfalls kovalent gebunden werden können.

5 Mit diesen bekannten hydrophoben Latices wird zwar das Problem Nr. 2 (s.o.) gelöst, alle übrigen Nachteile 10 bleiben aber unverändert bestehen.

Man hat deshalb auch schon versucht, anstelle hydrophober Latices hydrophile Gele als Träger für immunologisch aktive Substanzen zu verwenden. Da hydrophile Gele keine 15 oder nur sehr geringe Adsorptionseigenschaften haben, andererseits aber die kovalente Bindung von Proteinen an solche Gele bekannt ist, hat man "Mikrogele" vorschlagen, die aufgrund ihrer Herstellungsweise und ihres Teilchendurchmessers ebensogut als "Latices" bezeichnet 20 werden könnten. Solche hydrophilen Latices sind beispielsweise aus der US-PS 4 138 383 bekannt. Sie bestehen aus kugelförmigen Teilchen mit einem Durchmesser von weniger als 0,35 μm , die unter den Bedingungen einer durch freie Radikale initiierten wäßrigen Emulsionspolymerisation 25 hergestellt werden, wobei als Monomere Acrylamide, Acrylsäure, Methacrylsäure oder Acrylate verwendet werden. Als Emulgatoren werden beispielsweise Metallseifen verwendet. An die so erhaltenen hydrophilen Mikrogele werden biologisch und/oder immunologisch aktive Substanzen in an 30 sich bekannter Weise über Carbodiimid- oder Glutaraldehyd-Brücken kovalent gebunden. Damit sind zwar die Probleme Nr. 1 und 2 (s.o.) gelöst worden, nicht aber die Probleme Nr. 3 und 4, da die Emulsionspolymerisation nach wie vor unter Zusatz eines Emulgators oder Stabilisators durchgeführt werden muß.

Der Erfindung liegt die Aufgabe zugrunde, hydrophile Latexpartikel, ein Verfahren zu deren Herstellung und

ORIGINAL INSPECTED

20.10.00
5.9.

- 1 ein diese enthaltendes diagnostisches Mittel zu schaffen, mit denen es gelingt, alle vier oben genannten Nachteile zu vermeiden. Der Erfindung liegt also insbesondere die Aufgabe zugrunde, hydrophile Latexpartikel zu schaffen,
5 die in der Lage sind, biologisch und/oder immunologisch aktive Substanzen kovalent zu binden, die die Struktur und damit die Aktivität der biologisch aktiven Proteine nicht beeinträchtigen, deren Stabilisierung beim Zentrifugieren nicht gebrochen wird und die sich koagulieren
10 und anschließend wieder leicht resuspendieren lassen.

Diese Aufgabe wird gemäß der Erfindung durch aus einem Homo- oder Copolymerisat von in Wasser schwerlöslichen Monomeren bestehende hydrophile Latexpartikel gelöst, die
15 dadurch gekennzeichnet sind, daß sie durch Emulsionspolymerisation in Anwesenheit eines wasserlöslichen, Radikale bildenden Initiators, jedoch ohne jeden Zusatz eines Emulgators, Stabilisators oder Netzmittels herstellbar sind.

20 Nach einer bevorzugten Ausführungsform der Erfindung besteht mindestens ein Teil der Monomeren, aus denen die hydrophilen Latexpartikel aufgebaut sind, aus einem mindestens eine polymerisierbare C=C -Doppelbindung im
25 Molekül enthaltenden Epoxid.

Es hat sich überraschenderweise gezeigt, daß entgegen der in Fachkreisen seit langem herrschenden Meinung, die auch in dem eingangs zitierten Stand der Technik zum Ausdruck
30 gebracht wird, der Zusatz eines Emulgators, Stabilisators oder eines Netzmittels zur Durchführung der Emulsionspolymerisation gar nicht erforderlich ist. Damit entfällt aber die meist sehr schwierige und umständliche Entfernung von Emulgatorresten aus den polymeren Latexpartikeln, die
35 bisher zwingend erforderlich war, weil die als Emulgatoren verwendeten Metallseifen oder Tenside aus den Latexpartikeln diffundierten und die biologische Aktivität der an die Latexpartikel kovalent gebundenen Proteine beeinträchtigten oder vollkommen zerstörten.

1 Als besonders vorteilhaft hat sich die Verwendung von
mindestens eine polymerisierbare Doppelbindung enthalten-
den Glycidyl-Verbindungen als Monomer erwiesen. Die
Struktur dieser Verbindungen weist in der polymerisier-
5 baren Doppelbindung einen hydrophoben und in der Epoxid-
Gruppe, dem Oxiran-Ring, zugleich einen hydrophilen Teil
auf. Die erfindungsgemäß entstehenden Latexsuspensionen
koagulieren nicht trotz Abwesenheit jeglichen Emulgators,
Stabilisators oder Netzmittels. Die Stabilisierung der
10 Latexsuspension wird auch beim Zentrifugieren nicht ge-
brochen. Da die endständigen Epoxidgruppen für verschie-
dene Umsetzungen (Hydrolyse, Ammonolyse, Aminolyse, Kon-
densationen) sehr leicht zugänglich sind, müssen die
15 Epoxidgruppen die Oberfläche der monodispers verteilten
Latexkügelchen so bedecken, daß sie in die Wasserphase
hinaus orientiert sind.

Als Monomere werden erfindungsgemäß vorzugsweise Glycidyl-
methacrylat, Glycidylacrylat, Glycidylvinyläther, Glyci-
20 dylvinylphthalat und 3,4-Epoxybut(1)en verwendet. Es kann
dabei ausschließlich eines dieser Monomere verwendet
werden, so daß die entstehenden hydrophilen Latexpartikel
ein Homopolymerisat darstellen, es kann aber auch ein
Gemisch dieser Monomere copolymerisiert werden.

25

Zur Steuerung des Gehaltes an Epoxidgruppen können mit
einer oder mehreren der genannten Glycidylverbindungen
auch andere Monomere copolymerisiert werden, beispiels-
weise Styrol, Diene, Acrylamide, Methacrylamide, Alkyl-,
30 Hydroxalkyl- und Aminoalkylacrylate, Alkyl-, HydroxY-
alkyl- und Aminoalkylmethacrylate, Vinyläther, Vinylester,
N-Vinylpyrrolidon und dergleichen.

Es kann auch in Gegenwart monomerer, polymerisierbarer
35 Derivate von Farbstoffen oder fluoreszierenden Verbindungen,
z.B. Fluorescein, polymerisiert werden. Auf diese Weise
werden farbige bzw. fluoreszierende Latexpartikel erhalten,
die sich zum Nachweis von Antigenen bzw. Antikörpern in
menschlichen oder tierischen Geweben eignen. Diese Nachweis-

ORIGINAL INSPECTED

1 methode eignet sich besonders vorteilhaft zur Herstellung von Gewebeschnitten in der Histologie. Als monomere, polymerisierbare Derivate werden vorzugsweise Farbstoffe bzw. fluoreszierende Verbindungen eingesetzt, in die in an sich bekannter Weise Methacryl- bzw. Acryl-Reste eingebaut worden sind.

Um die Schwerlöslichkeit der entstehenden Latexpartikel in Wasser zu erhöhen, können während der Emulsionspolymerisation übliche Vernetzungsmittel zugesetzt werden, beispielsweise Alkylen- oder Hydroxyalkylen diacrylate, Alkylen- oder Hydroxyalkylen dimethacrylate, Alkylenbis-acrylamide oder Alkylenbisacrylmethacrylamide, Divinylbenzol und dergleichen.

15 Als Initiator kann jeder üblicherweise für die Emulsionspolymerisation verwendete wasserlösliche Initiator verwendet werden; erfindungsgemäß werden vorzugsweise Peroxodisulfate, Peroxoborate, Wasserstoffperoxid oder geeignete Redoxsysteme eingesetzt.

Das erfindungsgemäße Verfahren der emulgatorfreien Emulsionspolymerisation von einem oder verschiedenen in Wasser schwerlöslichen Monomeren zur Herstellung der hydrophilen Latexpartikel ist gegenüber Luftsauerstoff bzw. freiem Sauerstoff überhaupt empfindlich. Der Sauerstoff muß deshalb sehr sorgfältig aus allen Polymerisationskomponenten und Gefäßen durch gründliches Auskochen, durch Destillation unter Inertgasatmosphäre oder durch Hindurchleiten von Stickstoff, Argon oder einem anderen Inertgas entfernt werden.

Die emulgatorfreie Emulsionspolymerisation wird erfindungsgemäß vorzugsweise mit einem Flottenverhältnis, bezogen auf die Volumina, zwischen Wasser- und Monomerenphase von 8 : 1 bis 16 : 1 durchgeführt.

Die Konzentration des in der wässrigen Phase gelösten Initiators beträgt vorzugsweise zwischen 0,5 und 1,5 g/l

1 und die Konzentration des Epoxids in der Monomerenphase
beträgt vorzugsweise 1 bis 100 Gew.-%.

5 Die Emulsionspolymerisation wird vorzugsweise bei einer Temperatur von 0 bis 80°C durchgeführt. Die Temperatur ist abhängig vom gewählten Initiator: bei Verwendung von Kaliumperoxodisulfat arbeitet man vorzugsweise bei 60 bis 70°C. Ebenfalls abhängig von der Wahl des Initiators ist die Reaktionsdauer, die zwischen 5 und 40 Stunden 10 beträgt.

15 Die erfindungsgemäßen hydrophilen Latexpartikel sind streng kugelförmige, monodispers verteilte und untereinander annähernd gleich große Teilchen mit einem Durchmesser von etwa 0,15 bis 1,5 µm.

20 Die hydrophilen Latexpartikel können nach beendeter Emulsionspolymerisation noch Reste nichtauspolymerisierter Monomerer enthalten, die durch Wasserdampfdestillation oder Dialyse beseitigt werden können. Auch hierbei kommt die besonders vorteilhafte Eigenschaft der erfindungsgemäßen hydrophilen Latexpartikel zum Tragen, die darin besteht, daß die Latexpartikel durch Zentrifugieren sedimentiert werden können, ohne daß die Stabilisierung 25 gebrochen wird, so daß sie anschließend wieder redispersiert werden können. Auf diese Weise kann der erfindungsgemäße Latex durch mehrfaches Zentrifugieren und Dekantieren auf einfache Weise gereinigt werden.

30 Die endständigen freien Epoxidgruppen des erfindungsgemäßen Latex sind gegenüber den unterschiedlichsten chemischen Substanzen hoch reaktionsfähig und können deshalb leicht hydrolysiert, mit Periodat oder Periodsäure zur Aldehydgruppe oxidiert, mit Ammoniak, primären Aminen, 35 Diaminen oder Hydrazinen zu prim. od. sek. Aminogruppen umgesetzt oder mit Hilfe anderer bekannter Reaktionen modifiziert werden. Die Emulsion des erfindungsgemäßen Latex weist trotz Fehlens eines Emulgators eine derart hohe Stabilität auf, daß die Modifizierung der Epoxidgruppen

BAD ORIGINAL

10.10.2000

1 gewünschtenfalls auch schon während der Emulsionspolymerisation durchgeführt werden kann, so daß bereits aus der Polymerisationsreaktion ein Latex entsteht, der an der Oberfläche beispielsweise mit primären Aminogruppen
5 modifiziert ist. Die modifizierten oder derivatisierten Epoxidgruppen stehen dann für die "Kupplung" mit biologisch und/oder immunologisch aktiven Proteinen, die somit kovalent an die als Träger fungierenden hydrophilen Latexpartikel gebunden werden, zur Verfügung.

10.

Die eingangs genannte Aufgabe wird somit weiter durch die Verwendung der erfindungsgemäßen hydrophilen Latexpartikel als serologisch inerte Träger für biologisch und/oder immunologisch aktive Substanzen gelöst, beispielsweise als Träger für Peptide, Proteine, Enzyme, Hormone, Vitamine, Antigene, Antikörper und Mikroorganismen.

Gegenstand der Erfindung ist somit weiterhin ein diagnostisches Mittel, enthaltend erfindungsgemäße hydrophile Latexpartikel als Träger und an diesen Träger direkt oder über ein Kupplungsmittel als "Brücke" kovalent gebundene biologisch und/oder immunologisch aktive Substanzen der vorstehend genannten Art.

20 25 Die erfindungsgemäßen diagnostischen Mittel eignen sich besonders zum Einsatz in Radioimmuno- (RIA), Enzymimmuno- (EIA) und sogenannten ELISA (enzymelinked immunosorbent assay)-Tests.

30

35

1 Beispiel 1

In 80 ml destilliertem Wasser werden 0,08 g Kaliumperoxydisulfat ($K_2S_2O_8$) gelöst und dadurch von Luftsauerstoff befreit, daß 30 Minuten lang Stickstoff hindurchgeleitet wird. Gleichzeitig werden 10 ml Glycidylmethacrylat auf dieselbe Weise von Luftsauerstoff befreit. Beide Komponenten werden in einen Glasreaktor verbracht und weitere 10 Minuten lang mit Stickstoff behandelt. Danach wird der Reaktor geschlossen und die Reaktion unter ständigem Rühren 6 Stunden lang bei einer Temperatur von $65^\circ C$ durchgeführt. Nach dieser Zeit beträgt der Umsatz 98%. Das Reaktionsprodukt ist ein Latex aus kugelförmigen, monodispers verteilten Polyglycidylmethacrylat-Partikeln mit einem Durchmesser von 0,44 μm .

Beispiel 2

Wie in Beispiel 1 beschrieben, werden 160 ml destilliertes Wasser, in dem 0,08 g $K_2S_2O_8$ gelöst sind, und 10 ml eines Gemisches aus 15 Gew.% Glycidylmethacrylat und 85 Gew.% Styrol getrennt vom Sauerstoff befreit und 6 Stunden lang unter ständigem Rühren bei einer Temperatur von $65^\circ C$ miteinander umgesetzt. Danach beträgt der Umsatz 71,6%. Die nichtauspolymerisierten Restmonomeren werden durch Wasserdampfdestillation beseitigt. Die entstehenden monodispersen copolymeren Latexpartikel haben einen Durchmesser von 0,22 μm .

30 Beispiel 3

Wie in Beispiel 1 beschrieben, werden eine Lösung von 0,1 g $K_2S_2O_8$ in 100 ml destilliertem Wasser und 10 ml eines Gemisches aus 15 Gew.% Glycidylmethacrylat und 85 Gew.% Vinylacetat miteinander umgesetzt. Der Umsatz beträgt 80%. Die Restmonomeren werden durch Wasserdampfdestillation entfernt. Der entstehende Latex besteht aus monodispersen, kugelförmigen Teilchen mit einem Durchmesser

~~✓ 10.00~~

1 von 0,16 µm.

100 ml des so hergestellten Latex werden mit 100 ml
0,1 M-NaOH-Lösung vermischt und bei einer Temperatur von
5 etwa 25°C 24 Stunden stehengelassen. Auch während und
nach der Hydrolyse bleibt die Stabilität des Latex er-
halten. Die Emulsion wird zentrifugiert, der Überstand
abgegossen und die feste Phase wieder in Wasser redisper-
giert. Das Zentrifugieren und Redispergieren wird zweimal
10 wiederholt. Die entstehende neutrale Emulsion wird mit
1 M-H₂SO₄ auf einen pH-Wert von 3 gebracht und mit Period-
säure in einer den Epoxidgruppen äquivalenten Menge ver-
setzt. Die Oxidation wird bei 25°C etwa 24 Stunden lang
durchgeführt; anschließend werden die nichtumgesetzten
15 niedermolekularen Stoffe durch Dialyse entfernt. Die
modifizierten Latexpartikel der stabilen Emulsion ent-
halten 2,8 Gew.% oder 0,97 mMol/g an Aldehydgruppen.

Beispiel 4

20

Wie in Beispiel 1 beschrieben, werden eine Lösung von
0,1 g K₂S₂O₈ in 100 ml destilliertem Wasser und 10 ml
eines Gemisches aus 15 Gew.% Glycidylmethacrylat und
85 Gew.% Isopren bei einer Temperatur von 65°C 24 Stunden
25 lang umgesetzt. Der Umsatz beträgt 76%. Die Restmonomeren
werden anschließend durch Wasserdampfdestillation entfernt,
wobei stabile, monodispers verteilte kugelförmige Latex-
partikel mit einem Durchmesser von 0,25 µm entstehen.

30

100 ml dieser Emulsion werden anschließend mit 100 ml
wässriger Ammoniaklösung (25%ig) versetzt und 24 Stunden
lang bei Zimmertemperatur stehengelassen, wobei die
Epoxidgruppen durch Ammonolyse in Aminogruppen übergehen.
Das Reaktionsprodukt wird anschließend mit Periodsäure
35 behandelt, wobei ein Latex entsteht, der 4,5 Gew.% oder
1,55 mMol/g an Aldehydgruppen enthält.

16.

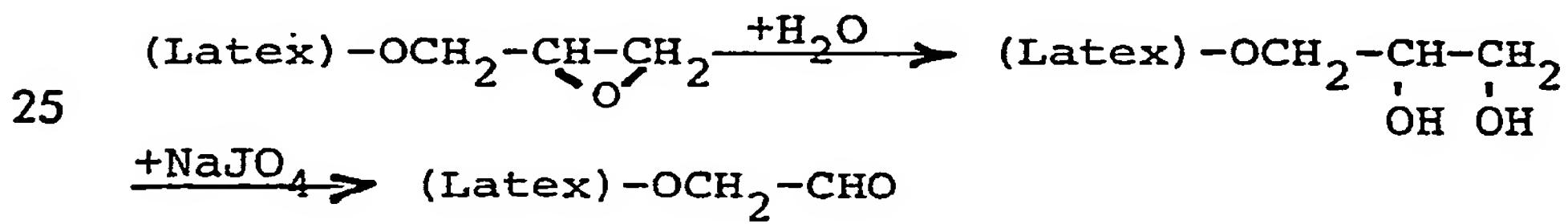
1 Beispiel 5

- Wie in Beispiel 1 beschrieben, werden eine Lösung von
1,5 g $K_2S_2O_8$ in 1,5 l Wasser und 15 ml Glycidylmethacry-
lat getrennt von Sauerstoff befreit und miteinander umge-
setzt. Weitere 120 ml von sauerstofffreiem Glycidylmethacry-
lat werden kontinuierlich während 6 Stunden unter Sauers-
stoffausschluß in das Reaktionsgefäß zugetropft. Danach
wird die Polymerisation noch 30 Minuten lang fortgesetzt.
Der Umsatz beträgt dann 85%, und die entstehenden Partikel
haben einen Durchmesser von 1,1 μm .

Beispiel 6

- 15 Wie in Beispiel 1 beschrieben, werden 10 ml eines Ge-
mischs von 1 Gew.% Glycidylmethacrylat und 99 Gew.%
Styrol und eine Lösung von 0,1 g $K_2S_2O_8$ in 100 ml destil-
liertem Wasser bei $65^\circ C$ während 22 Stunden polymerisiert,
wobei hydrophile Latexpartikel mit einem Durchmesser von
20 0,5 μm entstehen. Der Umsatz beträgt 90%.

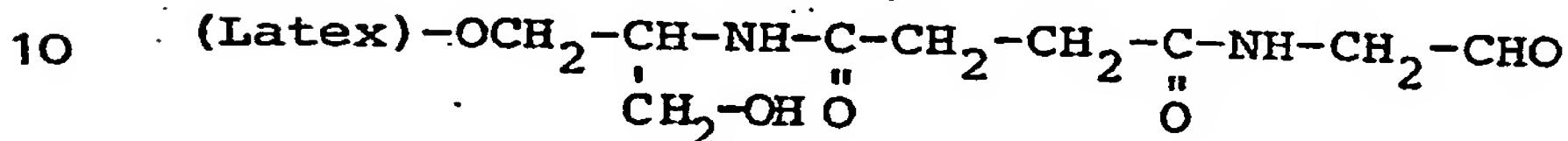
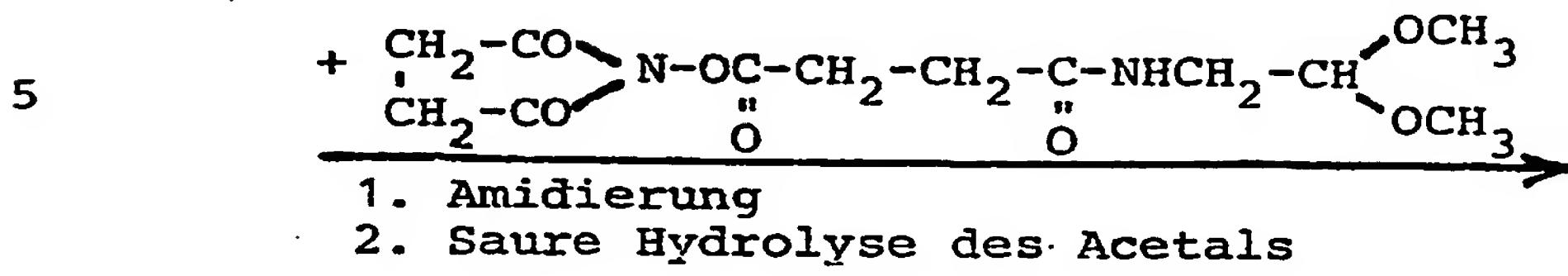
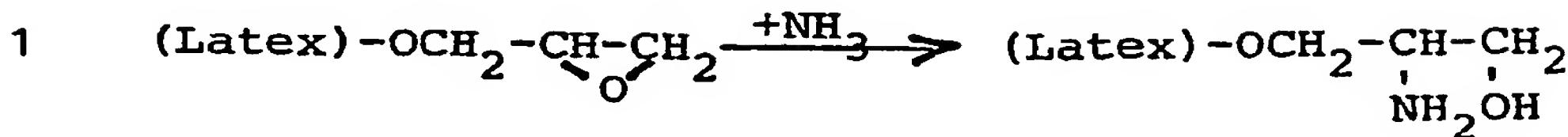
Beispiel 7



- 20 ml einer nach Beispiel 1 hergestellten Latex-Suspension werden mit 5 ml 2N Natronlauge über Nacht bei Raumtemperatur gerührt und dann 5 Std. gegen Wasser dialysiert. Die verbleibende Suspension wird nach Zusatz von 100 mg Natriumperjodat auf pH 3 eingestellt und über Nacht bei Raumtemperatur gerührt und dann 4 Std. gegen dest. Wasser dialysiert.

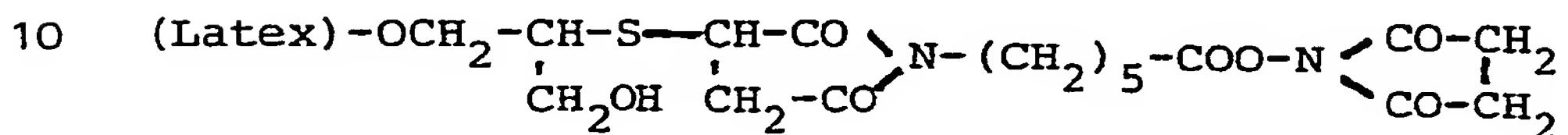
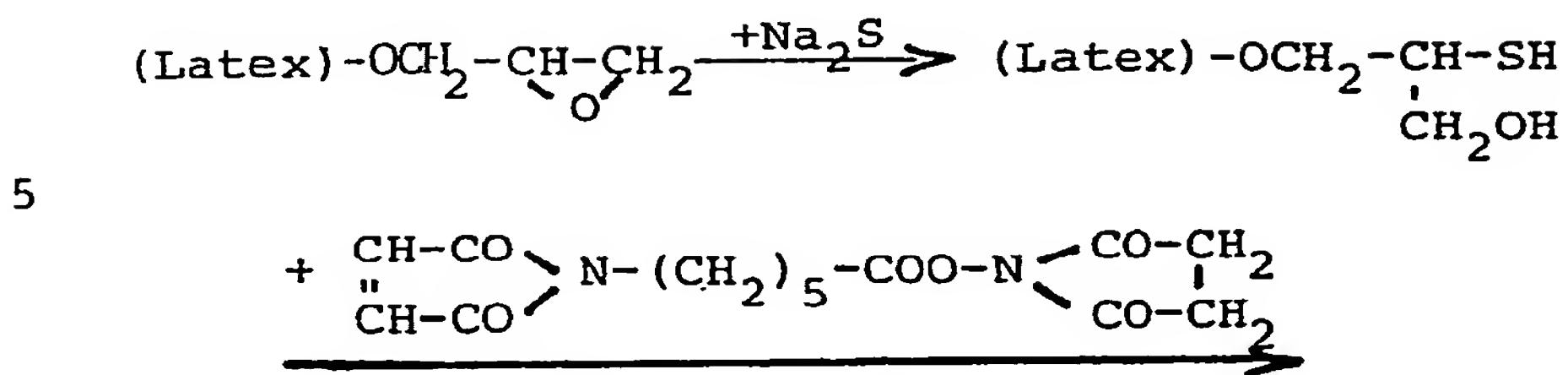
~~13.10.80~~

17.

Beispiel 8

20 ml einer nach Beispiel 1 hergestellten Latex-Suspension werden mit 10 ml konzentrierter Ammoniak-Lösung 20 Std. bei Raumtemperatur gerührt und 48 Std. gegen fließendes Wasser dialysiert. Die erhaltene Suspension wird abzentrifugiert. Der Stickstoff-Gehalt der Trockensubstanz liegt danach bei etwa 1 %, was einer Aminierung von etwa jeder 10. Epoxid-Einheit entspricht, bei einer bevorzugten Reaktion an der Oberfläche aber sicher einem höheren Derivatisierungsgrad entspricht. Die abzentrifugierte Festsubstanz wird mit 20 ml 0,1 N Natronlauge wieder aufgenommen. Dazu werden unter Rühren 1,5 g Bernsteinsäurehydroxysuccinimidester-amidoacetaldehyd-acetal (gelöst in 6 ml Dimethylformamid) getropft. Die entstehende Suspension wird noch 3 Std. gerührt, danach mit 1N Salzsäure auf pH 3 gebracht und dann 12 Std. gegen fließendes dest. Wasser dialysiert.

10.00
18.

1 Beispiel 9

20 ml einer nach Beispiel 1 hergestellten Latex-Suspension werden mit 0,5 g $\text{Na}_2\text{S} \cdot 9\text{H}_2\text{O}$ versetzt und 2 Tage bei Raumtemperatur gerührt. Anschließend wird gegen fließendes dest. Wasser dialysiert, bis die Suspension geruchsfrei ist, dann wird die Suspension abzentrifugiert. Die Trockensubstanz enthält etwa 2 % Schwefel, was einer Derivatisierung etwa jeder 10. Epoxid-Einheit entspricht, bei einer bevorzugten Reaktion an der Oberfläche aber sicher einem höheren Derivatisierungsgrad entspricht.
 Das abzentrifugierte Produkt wird mit 1 g 6-Maleinimido-hexansäure-hydroxysuccinimidester (gelöst in 6 ml Dimethylformamid) versetzt, 3 Std. bei Raumtemperatur gerührt und dann 12 Std. gegen fließendes dest. Wasser dialysiert.

30 Beispiel 10Bildung von Latex-gamma-Globulin-Konjugaten

1 ml gamma-Globulin-Lösung (enthaltend 56,6 mg Protein) werden mit jeweils 20 ml einer

~~15.10.80~~
19.

- 1 a) nach Beispiel 1 hergestellten,
 b) nach Beispiel 7,
 c) nach Beispiel 8 und
 d) nach Beispiel 9 derivatisierten
- 5 Latex-Suspension versetzt und 12 Std. bei Raumtemperatur dialysiert. Die verbleibenden Suspensionen werden abzentrifugiert. Anschließend wird im Überstand freies Protein bestimmt. Aus dem gefundenen Wert lässt sich der an die Latex-Teilchen gebundene Anteil berechnen. Danach enthält:
- 10 Ansatz a 8 mg gamma-Globulin, gebunden
 Ansatz b 43 mg gamma-Globulin, gebunden
 Ansatz c 15 mg gamma-Globulin, gebunden
 Ansatz d 19 mg gamma-Globulin, gebunden
- 15 Beispiel 11
- Bildung von Latex-IgG-Konjugaten
- 20 Wie in Beispiel 10 beschrieben werden aus einer IgG-Lösung und verschiedenen Latex-Suspensionen Latex-IgG-Konjugate hergestellt. Durch Antikörper-Komplexbildung wird die Beladung der Latex-Partikel mit IgG-Molekülen nachgewiesen.
- 25 Im folgenden werden zwei diagnostische Mittel als Beispiele für die Verwendung der erfindungsgemäßen hydrophilen Latexpartikel beschrieben, und zwar zur immunologischen Bestimmung von Thyroxin (T_4) mit Hilfe von T_4 -Antikörpern aus Anti- T_4 -Serum vom Schaf und zur Bestimmung von Humanthyrotopin (TSH) im Serum mit Hilfe der Doppelantikörper-Trenntechnik.
- 30

16 - 10 - 00
20.

1 Beispiel 12

5 Verwendung von Homopolyglycidylmethacrylat-Latexpartikeln
als Träger für Anti-T₄-Serum vom Schaf; diagnostisches
Mittel zur Durchführung eines T₄-ELISA

Für die Bestimmung von Thyroxin (T₄) mittels ELISA wurden
zunächst T₄-Antikörper aus einem Anti-T₄-Serum vom Schaf
an die erfindungsgemäßen hydrophilen Homopolyglycidyl-
10 methacrylat-Latexpartikel kovalent gebunden, indem letztere
nach einem der Beispiele 7-9 derivatisiert und in Analogie
zu den Beispielen 10 und 11 mit den T₄-Antikörpern umge-
setzt werden. Die so erhaltenen solid-face-Antikörper
stellen das erste Reagens für den Test dar. Als zweites
15 Reagens wird T₄ in an sich bekannter Weise mit einem hier-
für geeigneten Enzym, beispielsweise Peroxidase (POD) oder
β-Galaktosidase (β-Gal), markiert, d.h. zu einem Enzym-
konjugat "gekoppelt". Als Enzym wird im vorliegenden Bei-
spiel β-Gal verwendet. Das dritte Reagens ist die einen
20 unbekannten Gehalt an T₄ aufweisende Probe und das vierte
Reagens ein übliches Substrat für die β-Gal des Enzym-
konjugats, und zwar im vorliegenden Falle Nitrophenyl-β-
galactosid in Tris-HCl-Puffer, pH 7.3.

25 Das Testprinzip beruht auf dem Ablauf folgender drei
Reaktionen:

1. Der immunologischen Reaktion zwischen den an die
hydrophilen Latexpartikel kovalent gebundenen T₄-
30 Antikörpern einerseits und dem enzymmarkierten T₄
("Enzymkonjugat") und dem in der Probe enthaltenen
freien T₄ andererseits. Bei dieser Reaktion findet
also eine kompetitive Bindung zwischen den solid-
face-Antikörpern, dem Enzymkonjugat und dem T₄ der
35 Probe statt.

17.10.2000
21.

- 1 2. Der B/F-Trennung (B=bound, F=free). Es handelt sich
hier also um eine Trennung von gebundenem (bound)
und ungebundenem (free) Enzymkonjugat. Diese Trennung
kann in vorteilhafter Weise durch Zentrifugieren oder
5 durch Dialyse, beispielsweise gegen Wasser oder eine
geeignete Pufferlösung, erreicht werden.
- 10 3. Der Enzymnachweisreaktion, die zwischen dem Enzym-
konjugat und dem üblicherweise verwendeten, für das
eingesetzte Enzym spezifischen, Substrat abläuft und
die kolorimetrisch oder auf andere bekannte Weise ver-
folgt werden kann. Die Enzymaktivität kann entweder
im Zentrifugat (free-Anteil) oder in dem resuspendierten
Niederschlag (bound-Anteil) erfolgen.

15

Versuchsdurchführung

Die in oben angegebener Weise hergestellte Latex-anti-T₄-Suspension wird im Wasser oder Pufferlösung im Verhältnis 1:1000 verdünnt. 0,5 ml dieser Suspension werden mit 100 µl einer T₄-Serum-Standardlösung mit verschiedenem, jeweils bekanntem T₄-Gehalt und 100 µl einer T₄-β-Gal-Konjugat-Lösung versetzt. Das Reaktionsgemisch wird 30 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Während der Inkubation wurde ein Ansatz ständig geschüttelt, während ein zweiter Ansatz mit gleichem T₄-Standardgehalt lediglich stehen gelassen wurde. Danach wurde jeweils die Suspension zentrifugiert und der Überstand, in dem sich die F-Phase befindet, abgetrennt. Die B-Phase, also das an die solid-phase-Antikörper gebundene T₄-β-Gal-Konjugat, befindet sich im Niederschlag. Zur Bestimmung der Enzymaktivität wird dieser in überschüssiger Substrat-Lösung, bestehend aus

35 450 mg/l p-Nitrophenyl-β-galactosid (Fa. Sigma)
100 mM Natriumchlorid
10 mM Magnesiumchlorid
10 mM Tris-Puffer/HCl
0,4 % (V/V) Mercaptoäthanol
pH-Wert 7.3

18.10.80
22.

1 versetzt und in bekannter Weise die Extinktion bei einer Wellenlänge von 405 nm gemessen. Es zeigte sich, daß die ohne äußere mechanische Durchmischung in der Schwebew gehaltenen Latexpartikel ein um etwa 11 % verringertes Signal ergeben.
5

Nachdem auf diese Weise die T_4 -Eichkurven ermittelt wurden, 10 wurden anschließend in derselben Weise Bestimmungen durchgeführt, bei denen anstelle von 100 μl T_4 -Standardserum jeweils 100 μl von Proben unbekannten T_4 -Gehalts eingesetzt und die Extinktion der B-Phasen nach der Resuspendierung in Substratlösung gemessen werden.

15 Es wurde festgestellt, daß die hydrophilen Latexpartikel als Träger für Antikörper und auch Antigene hervorragend geeignet sind und deren Immunreaktivität nicht beeinträchtigen. Sie können daher mit großem Vorteil bei solid-
20 face-Enzymimmunotesten als Träger eingesetzt werden. Weiter wurde festgestellt, daß die hydrophilen Latexpartikel in Puffermilieu über lange Zeit hinweg in der Schwebew bleiben, daß die Dichte der Partikel also etwa gleich eins ist. Darüber hinaus sind die erfundungsgemäßen hydrophilen
25 Latexpartikel gut zentrifugierbar und resuspendierbar, ohne an Immunreaktivität einzubüßen.

Beispiel 13

30 Enzymimmunoassay (EIA) zur Bestimmung von Human-Thyreotropin (TSH)

Die Bestimmung von TSH in Humanserum ist von erheblicher Bedeutung für die Diagnose von Schilddrüsenerkrankungen.
35 Eine primäre Hypothyreose erkennt man an einer stark erhöhten Basal-TSH-Konzentration (10 bis 100 μU TSH/ml). Darüber hinaus kann eine Hyperthyreose mit Sicherheit dann ausgeschlossen werden, wenn der TSH-Basalwert im

✓ 10.10.80
23.

- 1 Serum von 0,5 bis 3 μ U/ml nach Stimulation mit TRH (Thyroidea-releasing-hormon) nicht ansteigt. Steigt der TSH-Wert dagegen um mindestens 2,5 μ U/ml, jedoch um nicht mehr als 25 μ U/ml, dann ist der Schilddrüsen-Stoffwechsel mit hoher Wahrscheinlichkeit ungestört. Ein Anstieg um mehr als 25 μ U/ml von einem mehr oder weniger leicht erhöhten Basalwert lässt auf eine latente präklinische Hypothyreose schließen. Es sind bereits Enzymimmunoassays für TSH bekannt (Clinica Chemica Acta 67, 263 - 268 (1976); enzyme labelled immunoassay of hormones and drugs, herausgegeben von S.B. Pal, Walter de Gruyter, Berlin und New York, 1978, S. 327 - 337; Analytical Biochemistry 96, 419 - 425 (1979)). Diese bekannten Bestimmungsmethoden benötigen jedoch übermäßig lange Inkubationszeiten (bis zu 5 Tage), sind unempfindlich (5 μ U TSH/ml) oder setzen aufwendige Meßgeräte voraus (Fluorometer oder Lumino-meter), wobei außerdem eine Vorrichtung zum Mischen der Ansätze erforderlich ist.
- 20 Die Verwendung der erfindungsgemäßen hydrophilen Latexpartikel ermöglicht nun eine photometrische Bestimmung des TSH in einer Gesamtinkubationszeit von nur 2 1/2 Tagen nach der Doppelantikörper-Trenntechnik. Dabei wird der zweite Antikörper an die erfindungsgemäßen hydrophilen Latexpartikel kovalent gebunden. Die gebundene Enzymaktivität wird dann nach einer B/F-Trennung gemessen. Da die Latexpartikel eine Dichte aufweisen, die nicht wesentlich höher als diejenige von Wasser ist, bleiben sie auch während der Enzymreaktion in der Schwebewo-
25 durch das übliche Mischen entfällt. Bei Verwendung von sehr verdünnten Latexsuspensionen, die aufgrund der hohen Beladbarkeit mit Antikörpern ohne weiteres möglich ist, entfällt auch das Zentrifugieren der Partikel nach Ablauf der Enzymreaktion, da durch die Suspension hindurch
30 photometrisch gemessen werden kann.
35

~~20.10.00~~

24.

1 Im Gegensatz zu den üblicherweise in immunologischen
Testverfahren verwendeten Latices lassen sich die anti-
körperbeladenen, erfindungsgemäßen hydrophilen Polyglycidyl-
methacrylatpartikel nach dem Zentrifugieren leicht re-
5 suspendieren. Aus demselben Grund zeigt sich eine sehr
geringe nichtspezifische Adsorption des enzymmarkierten
Antigens (gebundene Aktivität in Abwesenheit vom primären
Antikörper).

10 Versuchsdurchführung

0,2 ml TSH-Standard (internationales Referenzpräparat
MRC 68/38 in TSH-freiem Serum) werden mit 0,1 ml einer
1:150000 Verdünnung in Wasser oder geeigneter Puffer-
15 lösung eines an sich bekannten Anti-TSH-Antiserums, bei-
spielsweise von Meerschweinchen, inkubiert. Nach 12 Stunden
werden 0,1 ml einer Lösung eines Enzymkonjugats, bestehend
aus an Glukoseoxidase (GOD) kovalent gekoppeltem TSH (ent-
sprechend ca. $1,5 \times 10^{-9}$ g TSH), zu dem Gemisch der ersten
20 Stufe pipettiert. Zu diesem Gemisch werden nach weiteren
12 Stunden 0,1 ml einer Latexsuspension pipettiert. Die
Suspension enthält 0,1 bis 1 mg/ml Methacrylatlatex, wo-
bei - wie in Beispiel 11 beschrieben - pro 1000 mg der
trockenen Latexpartikel 5 bis 150 mg Protein einer Immun-
25 globulinfraktion, die aus einem Ziegenantiserum gegen
Meerschweinchen-IgG gewonnen wurde, hinzugefügt und so an
die hydrophilen Latexpartikel kovalent gebunden worden
sind. Nach einer Stunde wird zentrifugiert und der Nieder-
schlag der Latexpartikel mit 1 ml einer geeigneten Puffer-
30 lösung gewaschen, wodurch die Latexpartikel resuspendiert
werden. Anschließend wird erneut mehrfach zentrifugiert
und gewaschen. Die Überstände werden verworfen.

35

ORIGINAL INSPECTED

21.10.80
IS.

1 Zu jedem Ansatz wird 1 ml einer Substratlösung für die GOD pipettiert und kurz geschüttelt. Die Latexpartikel bleiben danach mindestens 2 Stunden lang gleichmäßig suspendiert. Danach wird die Suspension in eine Meßküvette überführt und die Extinktion bei 405 nm gemessen.
5 Von jeder Extinktion wird ein Substratleerwert L_1 , abgezogen. L_1 ist die Extinktion von 1 ml Substratlösung, die die gleiche Masse beladener Latexpartikel enthält wie die oben erwähnte Latex-Suspension, die zu dem Gemisch aus Anti-TSH-Antiserum und TSH-GOD zugegeben wurde.
10

Die so ermittelten Extinktionen werden für verschiedene Standardkonzentrationen an TSH aufgezeichnet. Mit Hilfe dieser Eichkurven werden die Konzentrationen von TSH in klinischen Proben unbekannten Gehaltes anhand der ermittelten Extinktionen abgelesen.

Als geeignete Pufferlösung wird vorzugsweise eine 0,04 N Phosphat-Lösung, pH 7,4, verwendet, die 0,005 M EDTA, 0,1 % Rinderserumalbumin sowie 0,15 M NaCl enthält.
20

Als GOD-Substratlösung wird bevorzugt eine wässrige Lösung eingesetzt, die 5 g/100 ml Glukose, 100 mg/100 ml 2,2'-Azino-di-(β -ethyl-benzthiazolon-sulfonsäure(6) β) (ABTS), 5 mg/100 ml Peroxidase (POD), 0,05 M Phosphatpuffer, pH 5,6, enthält.
25

Zum Vergleich wurde der TSH-Gehalt dreier Serumproben sowohl mit dem vorstehend beschriebenen EIA (A) als auch mit Hilfe eines bekannten Doppelantikörper-RIA (B) bestimmt. Wie die folgende Tabelle zeigt, stimmen die jeweils ermittelten Werte gut überein:
30

~~22~~ 10.00
26.

1

(A)

(B)

5

Serum 1 11,2 µU/ml

12,5 µU/ml

Serum 2 7,3 µU/ml

7,1 µU/ml

Serum 3 3,8 µU/ml

4,5 µU/ml

- 10 Auch aus der vorstehend beschriebenen TSH-Bestimmung ergibt sich, daß die erfindungsgemäßen hydrophilen Latexpartikel als Träger für biologisch und/oder immunologisch aktive Substanzen, insbesondere für Antikörper hervorragend geeignet sind.

15

Ermittlung der unspezifischen Bindung

- 20 Eine TSH-Standard-Probe wird in der oben unter "Versuchsdurchführung" beschriebenen Weise behandelt (Probe C) und mit einer weiteren gleichartigen Probe (Probe D) verglichen, die nahezu den identischen Umsetzungen wie Probe C unterworfen worden ist. Es wurde lediglich das Anti-TSH-Antiserum weggelassen. Der Vergleich der für die beiden Proben C und D in der Suspension gemessenen Extinktionen:

25

	Probe C	Probe D
Extinktion gemessen in der Suspension abzüglich L ₁	1,028	0,015

30

- zeigt, daß die unspezifische Bindung weniger als 1,5 % beträgt.

35

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning
Operations and is not part of the Official Record**

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- BLACK BORDERS**
- IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES**
- FADED TEXT OR DRAWING**
- BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING**
- SKEWED/SLANTED IMAGES**
- COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS**
- GRAY SCALE DOCUMENTS**
- LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT**
- REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY**
- OTHER:** _____

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.